





© BSN 2006

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Mangala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Komposisi .....	1
4 Syarat mutu .....	1
5 Pengambilan contoh .....	2
6 Cara uji .....	2
7 Syarat lulus uji .....	3
8 Pengemasan.....	3
9 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Metode pengambilan contoh bihun.....	4
Lampiran B (normatif) Rancangan pengambilan contoh .....	6
Lampiran C (informatif) Penjelasan mengenai penerimaan pengambilan contoh .....	8
Bibliografi.....	31



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Bihun* ini merupakan revisi SNI 01-2975-1992 yang disiapkan oleh Panitia Teknis Makanan dan Minuman.

Maksud dan tujuan penyusunan standar ini adalah sebagai acuan sehingga bihun yang beredar di pasar dapat terjamin mutu dan keamanannya.

Dalam merumuskan SNI ini telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No.7 Tahun 1996 tentang Pangan;
2. Undang-undang RI No.8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen;
3. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan;
4. Kumpulan peraturan perundang-undangan di bidang Makanan jilid III Tahun 1993-1994, Dij. Jen. POM, Departemen Kesehatan.

Standar ini telah dibahas melalui rapat konsensus pada tanggal 8 Maret 2005 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil-wakil dari konsumen, produsen, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, laboratorium uji dan instansi terkait lainnya.





## Bihun

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji bihun.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **bihun**

produk makanan kering yang dibuat dari tepung beras sebagai bahan utama dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan melalui proses ekstrusi sehingga diperoleh bentuk seperti benang

#### 2.2

##### **ekstrusi**

pembuatan makanan yang diolah dengan memberikan tekanan pada adonan agar mengalir melalui lubang sehingga diperoleh bentuk seperti benang

### 3 Komposisi

#### 3.1 Bahan baku utama

Beras

#### 3.2 Bahan pangan lain

Air

#### 3.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk produk bihun sesuai dengan peraturan tentang Bahan Tambahan Pangan.

### 4 Syarat mutu

Syarat mutu bihun sesuai Tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1 Syarat mutu**

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Warna	-	normal
2	Benda asing	-	tidak ada
3	Daya tahan	-	tidak hancur jika direndam dalam air pada suhu kamar selama 10 menit



Tabel 1 (Lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
4	Kadar air	% fraksi massa	maks. 12
5	Kadar abu	% fraksi massa	maks. 1
6	Protein (N x 6,25)	% fraksi massa	min. 4
7	Cemaran logam		
7.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0
7.2	Tembaga (Cu)	mg/kg	maks. 10,0
7.3	Seng (Zn)	mg/kg	maks. 40,0
7.4	Raksa (Hg)	mg/kg	maks. 0,05
8	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5
9	Cemaran mikroba		
9.1	Angka lempeng total	Koloni/g	maks. $1,0 \times 10^6$
9.2	Kapang	Koloni/g	maks. $1,0 \times 10^4$
9.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3

## 5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh seperti tercantum pada lampiran A, dengan rancangan pengambilan contoh seperti pada lampiran B.

## 6 Cara uji

Cara uji untuk semua kriteria uji, seperti di bawah ini:

1. Persiapan contoh untuk uji keadaan dan benda asing seperti pada Lampiran D.1
2. Keadaan (bau dan warna) seperti pada Lampiran D.2.
3. Benda asing seperti pada Lampiran D.3
4. Daya tahan seperti pada Lampiran D.4
5. Persiapan contoh uji kimia seperti pada Lampiran D.5
6. Kadar air seperti pada Lampiran D.6
7. Kadar abu seperti pada Lampiran D.7
8. Protein seperti pada Lampiran D.8
9. Timbal (Pb), tembaga (Cu), dan seng (Zn) seperti pada Lampiran D. 9.1
10. Raksa (Hg) seperti pada Lampiran D.9.2
11. Cemaran arsen (As) seperti pada Lampiran D.10
12. Angka lempeng tempeng total (metode *plate count*) seperti pada Lampiran D.11.1
13. Kapang seperti pada Lampiran D.11.2
14. Coliform dan *E. Coli* seperti pada Lampiran D.11.3



## 7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai pasal 5.

## 8 Pengemasan

Bihun dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 9 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.





## Lampiran A (normatif)

### Metode pengambilan contoh bihun

#### A.1 Prinsip

Pengambilan contoh bihun yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL 6,5 dan contoh diambil secara acak.

#### A.2 Penerapan pengambilan contoh

##### A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) Ukuran lot (N);
- c) Ukuran kemasan terkecil (berat bersih dalam kg atau lb);
- d) Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalkan penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

##### A.2.2 Inspeksi

- a) Pemilihan tingkat Inspeksi berdasarkan:  
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).  
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat Inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih menyakinkan.
- b) Tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil bihun
- c) Tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1.
- d) Ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot.
- e) Uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar.
- f) Gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A.
- g) Nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c).

##### A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

###### A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 1200 karton yang berisi kemasan berukuran 12 lb x 2,5 lb setiap kartonnya. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.



- a. Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b. Ukuran kemasan : 2,5 lb
- c. Tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, lampiran A.1)
- d. Ukuran contoh (n) : 13
- e. Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

#### A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan Inspeksi ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a. Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b. Ukuran kemasan : 2,5 lb
- c. Tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, lampiran A.1)
- d. Ukuran contoh (n) : 21
- e. Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 3

#### A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, yang diterima sebanyak 4 dan 6 berturut-turut.



**Lampiran B**  
(normatif)

**Rancangan pengambilan contoh**

**B.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)**

**Tabel B.1.1 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13

**Tabel B.1.2 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

**Tabel B.1.3 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13



**B.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6.5)****Tabel B.2.1 Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg (2,2 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19

**Tabel B.2.2 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

**Tabel B.2.3 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg (10 lb)**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19



## Lampiran C (informatif)

### Penjelasan mengenai penerimaan pengambilan contoh

#### C.1 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh adalah proses penarikan atau pemilihan kemasan atau unit contoh dari sebuah lot atau hasil produksi. Hasil dari pengambilan contoh, berupa informasi perihal prakiraan penilaian untuk menerima, menolak atau menegosiasikan pembelian. Prosedur pengambilan contoh yang meliputi ukuran contoh dan kriteria penerimaan biasanya dikenal sebagai "pengambilan contoh".

Sekarang ini banyak sistem penerimaan pengambilan contoh yang dapat digunakan. Suatu metode yang tepat untuk satu produk atau tipe inspeksi mungkin tidak cocok sama sekali untuk produk atau sistem inspeksi yang lain. Metode yang terpilih ditetapkan berdasarkan besarnya kebutuhan pengguna.

Dalam pengembangan penerimaan pengambilan contoh, pertimbangan awal diberikan sesuai evaluasi mutu produk akhir. Persyaratan awal tersebut dimulai dengan merusak kemasan. Tipe inspeksi ini dikenal sebagai "pengambilan contoh yang merusak". Selain kerusakan produk, tipe ini memerlukan waktu analisa yang cukup panjang. Waktu analisa dan kehilangan nilai ekonomis dalam tipe inspeksi yang merusak menjadi faktor pembatas yang signifikan dalam pengembangan metode pengambilan contoh guna evaluasi mutu dalam proses pengolahan makanan. Ukuran contoh harus relatif kecil supaya metode dapat diaplikasikan secara praktis.

#### C.2 Resiko

Tujuan dari metode pengambilan contoh yaitu harus menerima lebih banyak lot yang "baik" dan menolak lebih banyak lot yang "jelek". Karena faktor kemungkinan atau peluang dan kesempatan terkait dalam hal ini, maka diperlukan keputusan yang melibatkan elemen resiko. Faktor resiko ini harus diterima sebagai bagian dari suatu prosedur pengambilan contoh. Untuk meningkatkan ukuran contoh diperlukan metode yang mengurangi resiko bagi pembeli dari penerimaan mutu yang tidak sesuai. Dengan kata lain, makin besar contoh, makin berkurang resiko yang dilibatkan dalam penerimaan lot yang "jelek".

Tingkat inspeksi merupakan petunjuk jumlah relatif dari pengambilan contoh dan inspeksi harus menunjukkan lot produk atau golongan produk. Jika inspeksi lot dikemas dengan pengawasan ketat dan memenuhi persyaratan yang terdapat dalam standar, perubahan tingkat inspeksi tidak menimbulkan perubahan yang berarti bagi resiko pembeli dan penjual. Dengan kata lain, ini merupakan lot yang "baik" dan dihasilkan melalui pelaksanaan dan metode penarikan contoh yang baik.

Keefektifan metode pengambilan contoh dalam membedakan antara lot yang "baik" dan "jelek" dapat ditetapkan dengan Inspeksi melalui kurva OC (*Operating Characteristic Curve*) untuk variasi ukuran contoh. Sebagai contoh, jika sebuah lot diproduksi dengan cacat tidak lebih dari 6,5 %, lot akan memiliki selang kepercayaan 95 % setiap kali dengan metode pengambilan contoh yang menggunakan AQL 6,5. Di lain pihak, jika produksi mengandung jumlah cacat yang cukup besar, tingkat inspeksi harus lebih tinggi (misalnya ukuran contoh lebih besar) akan mengurangi resiko penerimaan lot yang tidak sesuai.



#### C.4 AQL

Salah satu petunjuk pertimbangan dalam mengembangkan statistik metode pengambilan contoh adalah dengan pemilihan tingkat mutu yang dapat diterima (*Acceptable Quality Level*). Kriteria ini ditentukan sebagai persentase maksimum cacat dalam lot dengan tingkat kepercayaan 95 %. Lot atau proses produksi yang mengandung lebih banyak produk yang cacat cenderung tidak akan diterima. Perbandingan antara yang ditolak dan diterima meningkat bila ukuran contoh meningkat dan bila persentase produk cacat dalam lot meningkat.

Dalam pengembangan rancangan pengambilan contoh ini, telah dipilih AQL 6,5 untuk penerimaan lot yang berhubungan dengan evaluasi mutu. Dengan kata lain, AQL 6,5 digunakan untuk menentukan apakah hasil Inspeksi suatu lot diterima atau ditolak.

#### C.5 Tingkat inspeksi

Metode pengambilan contoh ini menggunakan dua tingkat inspeksi yaitu tingkat inspeksi I dan II. Kedua tingkat inspeksi ini dapat diterapkan pada metode pengambilan contoh bagi inspeksi suatu komoditi, tergantung pada beberapa keadaan. Untuk tujuan penjualan yang normal maka tingkat inspeksi I yang direkomendasikan. Pada kasus bermasalah atau kontroversial digunakan tingkat inspeksi II. Ukuran contoh yang lebih kecil daripada yang dikehendaki pada tingkat I dan II dapat diterima, misal ketika produk dicek untuk pemasangan label atau untuk pendeteksian zat aditif yang tidak diizinkan. Bagaimanapun, kriteria penerimaan pada metode pengambilan contoh yang mengizinkan cacat 6,5 % tidak berlaku pada inspeksi tersebut.

#### C.6 Kurva OC

Resiko pembeli dan penjual yang berhubungan dengan ukuran contoh dan mutu lot dapat dilihat pada kurva OC.

Dalam mempelajari kurva OC pada AQL 6,5, dapat ditarik beberapa kesimpulan, yaitu:

1. Semua kurva memiliki kemiringan yang sama walaupun kurva untuk contoh berukuran 6 lebih rata;
2. Semua kurva menunjukkan persaingan pada titik koordinat 6,5 % cacat dan penerimaan lot pada perkiraan 95 % selang kepercayaan.
3. Makin besar ukuran contoh, kurva semakin tajam dan semakin menunjukkan perbedaan, misal lot yang memiliki cacat lebih dari 6,5 % akan semakin banyak ditolak;
4. Ukuran contoh yang lebih besar tidak secara langsung berpengaruh terhadap penambahan contoh. Contohnya, untuk lot yang berukuran 6 (kurva E) dengan cacat sebesar 20 % maka lot yang diterima sebesar 65 %. Sedangkan untuk ukuran contoh 48 (kurva L) maka lot yang diterima sebesar 22 %. Pada contoh ini, *ratio* antara kemungkinan dari penerimaan hanya 3:1.

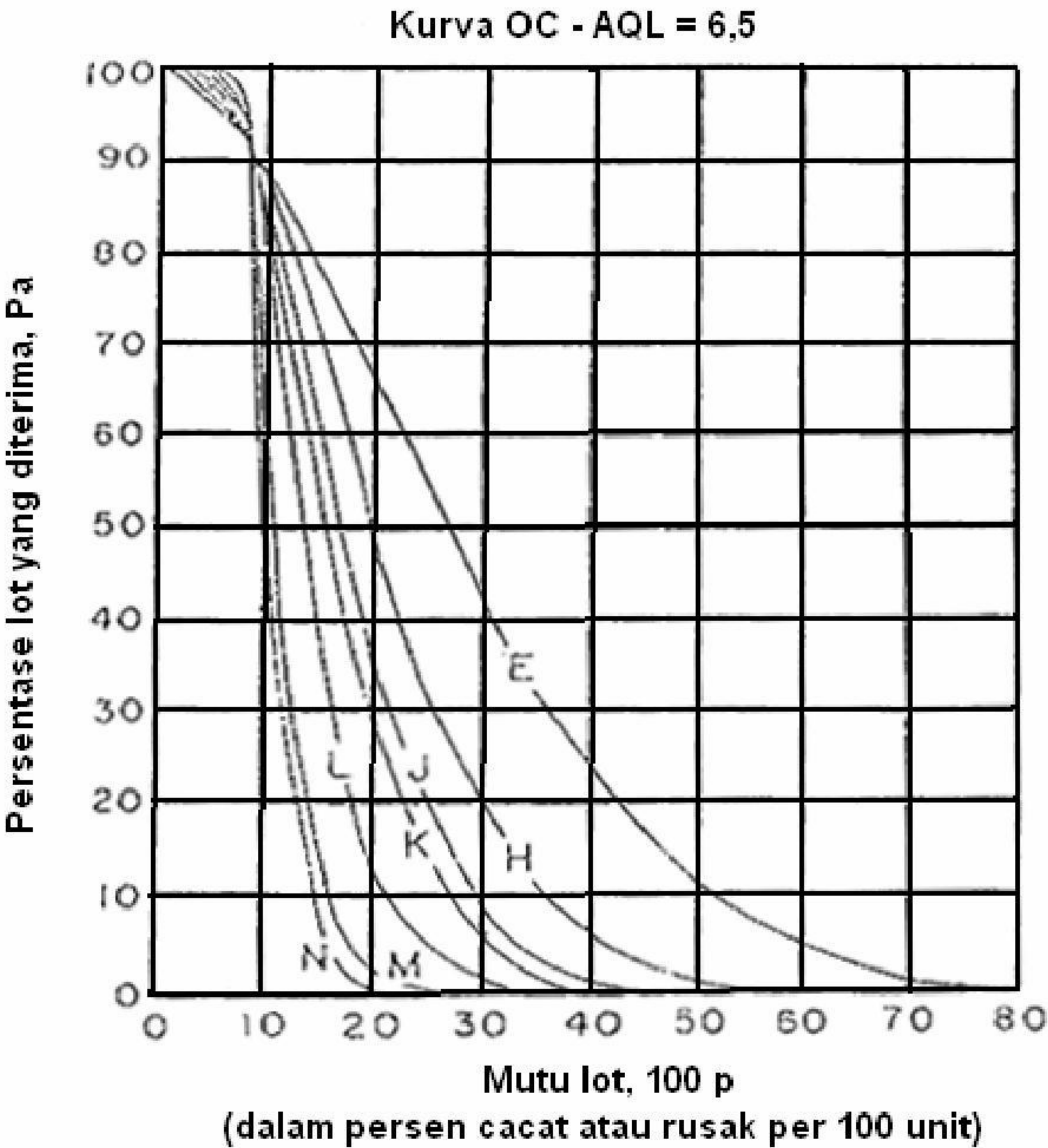
Contoh penggunaan kurva O.C. (AQL 6,5), jika ditetapkan persentase cacat suatu lot 10 % (AQL 10). Lot dengan cacat 6,5 % akan diterima pada perkiraan 95 %, dimana frekuensi penerimaan akan bertambah seiring dengan penurunan persen cacat. Tetapi, lot dengan cacat 10 % tidak memenuhi syarat dan jika lot tersebut merupakan lot yang marjinal, maka lot tersebut tidak diterima. Pengujian terhadap kurva OC dapat dilihat pada contoh yang berukuran 6 (kurva E) akan menerima lot yang marjinal sebesar 88 %; sedangkan contoh berukuran 84 (kurva M) lebih baik karena menerima lot sebesar 65 %.



Jika sebaliknya, suatu lot dengan cacat 30 % (AQL 30), ukuran contoh = 6 (kurva E) maka tingkat kepercayaan 42 %. Sedangkan ukuran contoh = 21 (kurva J) lot akan diterima dengan tingkat kepercayaan 8 % dan ukuran contoh = 84 (kurva M) lot tidak diterima.

AQL = 6,5

Identifikasi Kurva OC																	
E			H			J			K			L			M		
n	c	r	n	c	r	n	c	r	n	c	r	n	c	r	n	c	r
6	1	2	13	2	3	21	3	4	29	4	5	48	6	7	84	9	10



Gambar A.2.1 Kurva Operating Characteristic



## Lampiran D (normatif)

### Cara uji bihun

#### D.1 Persiapan contoh untuk uji keadaan dan benda asing

- Ambil contoh uji secukupnya dari masing-masing ukuran contoh yang telah diperoleh dari Metode Pengambilan Contoh (Lampiran A). Sisakan untuk uji kimia dan mikrobiologi.
- Letakkan dalam wadah plastik atau gelas yang bersih dan tertutup sebagai contoh uji keadaan dan benda asing.

#### D.2 Keadaan (bau dan warna)

##### D.2.1 Prinsip

Melakukan analisa terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung) untuk bau dan indera penglihatan (mata) untuk warna.

##### D.2.2 Cara kerja

- Cium contoh uji pada jarak kira-kira  $\frac{1}{2}$  cm dari hidung untuk mengetahui baunya dan amati pada jarak kira – kira 25 cm dari mata untuk mengetahui warnanya.
- Lakukan pengujian yang sama minimal 3 orang.

##### D.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tercium bau khas bihun maka hasil dinyatakan “normal” dan jika teramati warna khas bihun maka hasil dinyatakan “normal”;
- Jika tercium bau asing selain bau khas bihun maka hasil dinyatakan “tidak normal” dan jika teramati warna lain selain warna khas bihun maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

#### D.3 Benda asing

##### D.3.1 Prinsip

Contoh uji diperiksa secara organoleptik dengan indera penglihatan.

##### D.3.2 Cara kerja

Periksa contoh uji secara organoleptik apakah mengandung benda asing, yaitu benda lain selain bihun misalnya tanah, pasir, dan batu-batuan.



### D.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terlihat benda asing, maka hasil dinyatakan "tidak ada."
- b) Jika terlihat benda asing, maka hasil analisis dinyatakan "ada".

## D.4 Daya tahan

### D.4.1 Prinsip

Kemampuan bihun mempertahankan bentuknya berupa benang - benang dan tidak terputus - putus atau hancur apabila direndam dalam air pada suhu kamar selama 10 menit.

### D.4.2 Peralatan

- a) Gelas piala 250 ml dan 600 ml;
- b) Batang pengaduk gelas.

### D.4.3 Cara kerja

- a) Masukkan contoh uji secukupnya kedalam gelas piala 250 ml yang telah diisi air pada suhu kamar, sehingga terendam dan biarkan selama 10 menit;
- b) Aduk rendaman contoh uji tersebut menggunakan batang pengaduk gelas;
- c) Angkat contoh tersebut ke gelas piala 600 ml menggunakan batang pengaduk gelas.
- d) Amati contoh tersebut, apakah masih terlihat utuh berupa benang-benang dan sudah hancur

## D.5 Persiapan contoh untuk uji kimia

- a) Ambil bihun secukupnya dari masing-masing ukuran contoh yang telah diperoleh dari Metode Pengambilan Contoh (Lampiran A). Sisakan untuk uji mikrobiologi.
- b) Hancurkan dan giling dengan *disk mill* atau penggiling makanan yang sesuai sampai bahan lolos dari saringan No.20;
- c) Masukkan bihun yang lolos dari saringan ke dalam wadah plastik atau gelas yang bersih dan tertutup sebagai contoh uji kimia;

## D.6 Kadar air

### D.6.1 Prinsip

Kehilangan berat yang terjadi pada pemanasan dalam oven dengan suhu 130 °C selama 1 jam.

### D.6.2 Peralatan

- a) Eksikator yang berisi desikan;
- b) Botol timbang dengan penutup;
- c) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- d) Neraca analitik, terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.



**D.6.3 Cara kerja**

- Panaskan botol timbang beserta tutupnya dalam oven pada suhu  $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$  selama satu jam, dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan timbang ( $W_0$ ).
- Masukkan 2 g contoh kedalam botol timbang, tutup, dan timbang ( $W_1$ );
- Panaskan botol timbang yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dalam oven pada suhu  $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$  selama satu jam (satu jam setelah suhu oven  $130 ^\circ\text{C}$ );
- Tutup botol timbang ketika masih didalam oven, kemudian pindahkan kedalam eksikator, dinginkan selama 30 menit dan timbang ( $W_2$ );
- Lakukan pekerjaan duplo;
- Hitung kadar air dalam contoh.

**D.6.4 Perhitungan**

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan ;

$W_0$  adalah bobot botol timbang kosong (g);

$W_1$  adalah bobot botol timbang dan contoh (g);

$W_2$  adalah bobot botol timbang dan contoh setelah dipanaskan (g);

**D.6.5 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 2 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2 % analisis harus diulang kembali.

**D.7 Abu****D.7.1 Prinsip**

Pengabuan contoh dalam tanur pada suhu  $550 ^\circ\text{C}$ , zat-zat organik diuraikan menjadi air dan  $\text{CO}_2$ , sedangkan zat-zat anorganik yang tertinggal dihitung sebagai kadar abu.

**D.7.2 Peralatan**

- Eksikator yang berisi desikan;
- Cawan porselen, kuarsa atau platina dengan volume 30 sampai 50 ml;
- Tanur listrik terkalibrasi dengan ketelitian  $1 ^\circ\text{C}$ ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

**D.7.3 Cara kerja**

- Pijarkan cawan di dalam tanur listrik pada suhu  $(550 \pm 10) ^\circ\text{C}$ , yang sebelumnya dipanaskan dahulu pada penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil selama 1 jam.
- Dinginkan dalam eksikator selama 1 jam, kemudian timbang ( $W_0$ ).
- Timbang 3 g – 5 g contoh ke dalam cawan porselen ( $W$ ).
- Arangkan di atas penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil.
- Abukan dalam tanur pada suhu  $(550 \pm 10) ^\circ\text{C}$  sampai putih atau kelabu selama 5 jam -8 jam.
- Dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan timbang.



- g) Masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu yang sama selama 1 jam, dinginkan dalam eksikator dengan waktu yang sama dan timbang.
- h) Ulangi seperti pada butir g sampai diperoleh bobot tetap (selisih penimbangan yang terakhir dan yang sebelumnya maksimum 1 mg ( $W_1$ )).
- i) Lakukan pekerjaan duplo.
- j) Hitung kadar abu dalam contoh.

#### D.7.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100 \%$$

dengan;

W adalah bobot contoh (g);

$W_0$  adalah bobot cawan kosong (g);

$W_1$  adalah bobot cawan kosong dan abu (g).

#### D.7.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi (*RSD*) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau *RSD* lebih besar dari 4 %, maka analisis harus diulang kembali.

### D.8 Protein (N×6,25)

#### D.8.1 Prinsip

Senyawa protein didestruksi dengan asam sulfat dan katalis selen menjadi ammonium sulfat yang diuraikan menjadi amoniak pada saat destilasi menggunakan NaOH. Amoniak yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam.

#### D.8.2 Perekasi

- a) Campuran katalis selenium siap pakai atau;
- b) Campuran katalis selen pa;  
Campurkan 4 g serbuk  $\text{SeO}_2$ , 150 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  atau  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan 30 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- c) Indikator campuran BCG + MM;  
Timbang 0,15 g *bromocresol green* ( BCG ) dan 0,10 g merah metil ( MM ) lalu larutkan dalam 250 ml etanol 95 %;
- d) Larutan asam borat,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2 %;  
Larutkan 60 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dengan air suling menjadi 3000 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas;
- e) Larutan asam klorida, HCl 0,05 N;  
Encerkan 4,20 ml HCl pekat dengan air suling menjadi 1000 ml.
- f) Larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;  
Larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- g)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- h) Larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %;  
Larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.



**D.8.3 Peralatan**

- a) Labu kjeldahl 100 ml;
- b) Distilator dan kelengkapannya;
- c) Pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- d) Neraca analitik pembacaan sampai 0,1 mg;
- e) Buret 10 ml terkalibrasi;
- f) Batu didih.

**D.8.4 Cara kerja**

- a) Timbang 0,5 g – 1 g contoh dan masukkan ke dalam labu kjeldahl;
- b) Tambahkan 1 g campuran katalis selen dan 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat;
- c) Panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- d) Biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- e) Tambahkan 15 ml atau lebih larutan NaOH 30 % sampai berlebih (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- f) Sulingkan selama 5 menit – 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2 % yang telah diberikan beberapa tetes campuran indikator BCG + MM;
- g) Bilas ujung pendingin dengan air suling;
- h) Titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,05 N;
- i) Kerjakan penetapan blanko.

**D.8.5 Perhitungan**

$$\text{Kadar nitrogen (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,008 \times 6,25 \times 100 \%}{W}$$

dengan:

- V<sub>1</sub> adalah Volume HCl 0,05 N untuk titrasi contoh (ml) ;
- V<sub>2</sub> adalah Volume HCl 0,05 N untuk titrasi blanko (ml) ;
- N adalah Normalitas larutan HCl ;
- W adalah berat contoh (mg) ;
- 14,008 adalah Bobot Atom Nitrogen;
- 6,25 adalah faktor protein untuk bihun.

**D.8.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

**D.9 Cemarkan logam****D.9.1 Penetapan cemarkan logam Pb, Cu, dan Zn****D.9.1.1 Prinsip**

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Kemudian absorben dibaca menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).



**D.9.1.2 Peralatan**

- a) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Cawan porselen dengan kapasitas 50 ml – 100 ml;
- c) Penangas listrik;
- d) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- e) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu, Pb, dan Zn) terkalibrasi;
- f) Pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml;
- g) Labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur kapasitas 10 ml;
- i) Gelas piala 250 ml;
- j) Penangas air.

**D.9.1.3 Pereaksi**

- a) Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- c) Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
Encerkan 7 ml  $\text{HNO}_3$  65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  6 N;  
Encerkan 500 ml  $\text{HCl}$  37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 % dalam alkohol  
Larutkan 10 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.
- f) Kertas Whatman No. 41;
- g) Larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Cu;  
Larutkan 1,000 g Cu dengan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cu 1000  $\mu\text{g/ml}$  siap pakai.
- h) Larutan baku kerja Cu;
  - 1) Pipet 10,0 ml larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Cu ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  Cu.
  - 2) Pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml dan 4 ml larutan baku 100  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, encerkan dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ; 2,0  $\mu\text{g/ml}$  dan 4,0  $\mu\text{g/ml}$  Cu.
- i) Larutan baku kerja Pb;
  - 1) Pipet 10,0 ml larutan baku 1000  $\mu\text{g/ml}$  Pb ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 100  $\mu\text{g/ml}$ .
  - 2) Pipet masing-masing 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, dan 8 ml larutan baku kedua ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ; 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ; 4,0  $\mu\text{g/ml}$ ; 6,0  $\mu\text{g/ml}$  dan 8,0  $\mu\text{g/ml}$  Pb.
- j) Larutan baku Zn 1000  $\mu\text{g/ml}$ .  
Larutkan 1,000 g Zn dengan 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ini memiliki konsentrasi Zn 1000  $\mu\text{g/ml}$ .
- k) Larutan baku kerja Zn
  - 1) Pipet 10,0 ml larutan baku Zn 1000  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Zn 100  $\mu\text{g/ml}$ ;



- 2) Pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml dan 4 ml larutan baku kedua ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan HNO<sub>3</sub> 0,1 N sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 2,0 µg/ml dan 4,0 µg/ml Zn;

#### D.9.1.4 Cara kerja

- Timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselen/platina/kuarsa (m);
- Tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji terbakar sampai tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 % dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- Lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- Apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan abu dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO<sub>3</sub> pekat kira-kira 0,5 ml - 3 ml;
- Keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO<sub>3</sub> pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- Larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, atau 5 ml HNO<sub>3</sub> 1 N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V);
- Jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring Whatman No.41 ke dalam labu ukur 50 ml;
- Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- Baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA, pada sekitar panjang gelombang maksimum 324 nm untuk Cu, 283 nm untuk Pb, dan 213,8 nm untuk Zn;
- Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- Hitung konsentrasi logam dalam contoh.

#### D.9.1.5 Perhitungan hasil

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{(\text{konsentrasi logam dari kurva kalibrasi})}{m} \times V$$

dengan:

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

#### D.9.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11%, maka analisis harus diulang kembali.

### D.9.2 Penetapan cemaran logam raksa (Hg)

#### D.9.2.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa raksa dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg



yang dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

#### D.9.2.2 Pereaksi

- a) Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N;
- b) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 N;
- c) Batu didih;
- d) Campuran  $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$  (1:1);
- e) Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- f) Larutan molibdat 2 %.
- g) Larutan  $\text{SnCl}_2$ ;  
Campurkan 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilaminsulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan  $\text{NaBH}_4$ ;  
Larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- i) Larutan pengencer;  
Masukkan 300 ml – 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml  $\text{HNO}_3$  kemudian 67 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) Larutan baku 1000 mg/l Hg;  
Larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- k) Larutan baku kerja Hg;  
  - 1) Pipet 1 ml larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.
  - 2) Pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,005  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$  Hg.

#### D.9.2.3 Peralatan

- a) Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- c) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- d) Labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- e) Penangas listrik.

#### D.9.2.4 Cara kerja

##### D.9.2.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N, 20 ml  $\text{HNO}_3$  7 N, 1 ml larutan Natrium molibdat 2 %, dan 5 – 6 batu didih;
- b) Hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) Tambahkan 20 ml  $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$  (1:1) melalui pendingin;



- d) Hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) Tambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) Didihkan lagi selama 10 menit;
- g) Matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) Pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- i) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- j) Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- k) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- l) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- m) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- n) Hitung konsentrasi Hg dalam contoh.

#### D.9.2.4.2 Destruksi menggunakan digester microwave dengan sistim tertutup

- a) Timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat.
- b) Masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) Pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- f) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- i) Hitung konsentrasi Hg dalam contoh.

#### D.9.2.4.3 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi Hg (mg/kg)} = \frac{(\text{konsentrasi Hg dari kurva kalibrasi})}{m} \times V$$

dengan:

V adalah volume pelarutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

#### D.9.2.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.



**D.10 Cemarkaran arsen****D.10.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

**D.10.2 Peralatan**

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- Labu Kjeldahl 250 ml;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- Penangas listrik;
- Pipet Volumetrik 25 ml;
- Cawan porselen kapasitas 50 ml.

**D.10.3 Pereaksi**

- Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- Asam hipoklorida,  $\text{HClO}_4$  pekat
- Natrium boronhidrida;  
Larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai garis dalam labu ukur 500 ml.
- Asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
Larutkan 66 ml  $\text{HCl}$  37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Timah (II) klorida 10 %;  
Timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml  $\text{HCl}$  37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Kalium iodida, KI 20 %;  
Timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- Larutan standar induk arsen 1000 mg/l;  
Larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20 % dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja As;
  - Pipet 10 ml larutan baku arsen 1000 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  As.
  - Pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$  As.
  - Pipet masing-masing 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1  $\mu\text{g/ml}$  As ke dalam labu ukur 50 ml terpisah, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g/ml}$  dan 0,05  $\mu\text{g/ml}$  As.

**D.10.4 Persiapan contoh****D.10.4.1 Pengabuan basah**



- Timbang 5 g contoh dalam labu Kjeldahl dan tambahkan 20 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p.a dan 15 ml  $\text{HNO}_3$  p.a;
- Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- Tambahkan 10 ml  $\text{HClO}_4$  sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  p.a);
- Pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

#### D.10.4.2 Pengabuan kering

- Timbang 5 g contoh dalam cawan dan tambahkan 2,5 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dan 25 ml  $\text{HNO}_3$  pekat;
- Aduk dengan sempurna dan uapkan di atas penangas listrik hingga kering;
- Arangkan dalam tanur  $500^\circ\text{C}$  selama 2 jam dan basahkan dengan  $\text{HNO}_3$  p.a. Uapkan lagi dan abukan lagi selama 1 jam pada  $500^\circ\text{C}$  sampai didapat abu berwarna putih;
- Larutkan dengan larutan  $\text{HCl}$  1:3 dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

#### D.10.4.3 Destruksi dengan *microwave* (sistem tertutup)

- Timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- Masukkan ke dalam oven microwave digestion, dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- Setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

#### D.10.5 Cara kerja

- Siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- Pipet 25 ml larutan destruksi dan tambahkan 2 ml  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 ml  $\text{KI}$  20 % kemudian biarkan minimal 2 menit;
- Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- Tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,04  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,05  $\mu\text{g/ml}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- Baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/ml}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- Hitung konsentrasi As dalam contoh.

#### D.10.6 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi As (mg/kg)} = \frac{(\text{konsentrasi As dari kurva kalibrasi})}{m} \times V$$

dengan:

V adalah volume pelarutan akhir (ml);

m adalah bobot contoh (g).



**D.11 Cemarkan mikroba****D.11.1 Angka lempeng total (metode *plate count*)****D.11.1.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 24 jam – 48 jam pada suhu 35°C. ± 1 °C.

**D.11.1.2 Peralatan**

- a) Cawan petri gelas / plastik diameter 90 mm – 100 mm steril ;
- b) Pipet ukur 1ml, 5 ml, dan 10 ml;
- c) Penangas air;
- d) Lemari pengering (inkubator);
- e) Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- f) Otoklaf;
- g) Oven/alat sterilisasi kering.

**D.11.1.3 Pembenihan dan pengencer****a. *Buffered peptone water* (BPW)**

- |                            |         |
|----------------------------|---------|
| - <i>Peptone</i>           | 10 g    |
| - Natrium klorida          | 5 g     |
| - Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g   |
| - Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g   |
| - Air suling               | 1000 ml |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet 225 ml atau 450 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

**b. *Peptone 0,1 %* (<sup>b</sup>/<sub>v</sub>)**

- |                  |         |
|------------------|---------|
| - <i>Peptone</i> | 1 g     |
| - Air suling     | 1000 ml |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet 225 ml atau 450 ml larutan tersebut ke dalam botol 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

**c. *Plate count agar* (PCA)**

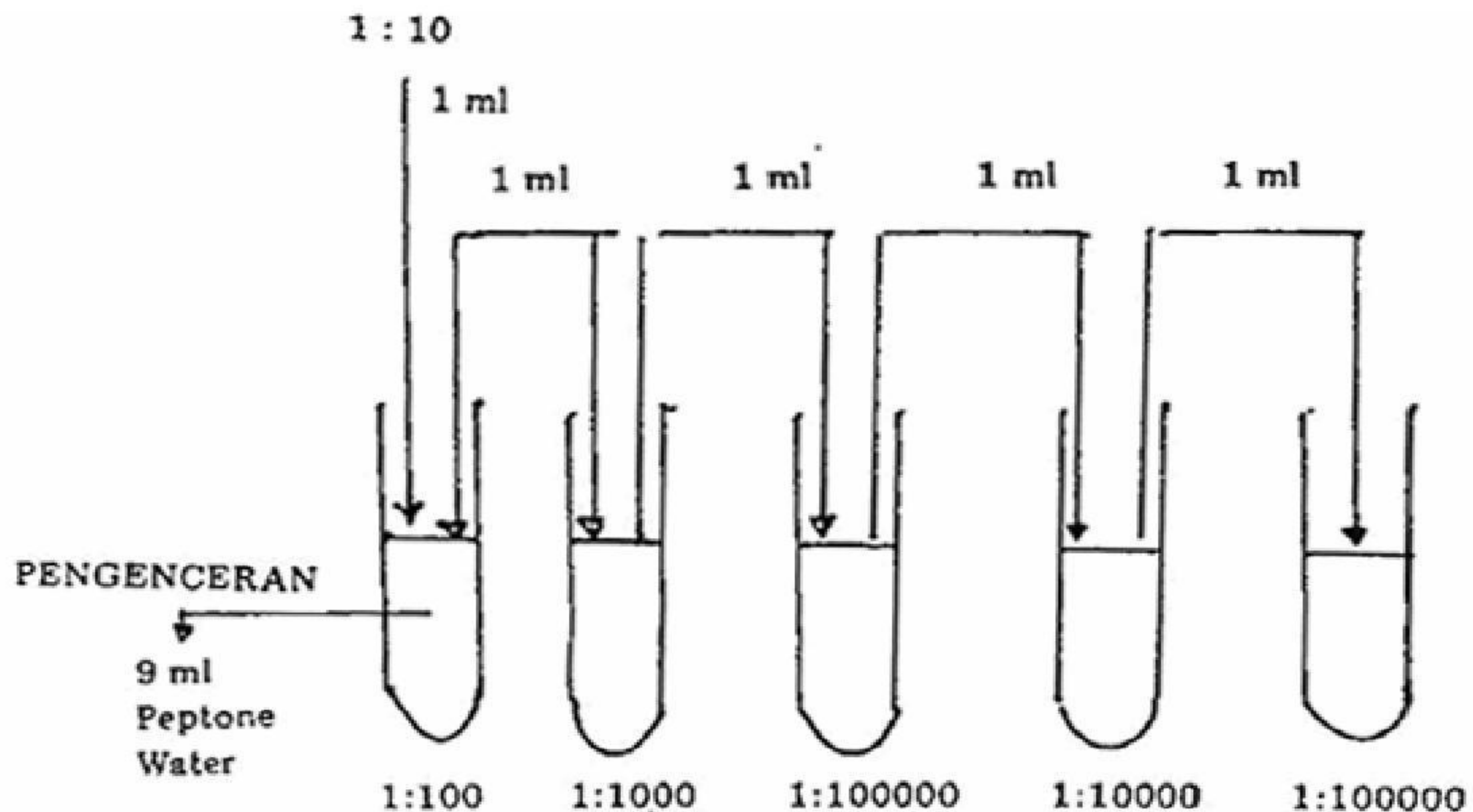
- |                                       |             |
|---------------------------------------|-------------|
| - <i>Yeast extract</i>                | 2,5 g       |
| - <i>Pancreatic digest of Caseine</i> | 5 g         |
| - Glukosa                             | 1 g         |
| - Agar                                | 15 g – 20 g |
| - Air suling                          | 1000 ml     |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol 1000 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

**D.11.1.4 Cara kerja**



- a) Timbang 25 g contoh, dan masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar B.1;



**Gambar B.1 Metoda pengenceran**

- b) Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran  $10^1$ –  $10^5$  ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- c) Tuangkan 12 ml – 15 ml media PCA ke dalam masing-masing cawan petri dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama yang telah dicairkan yang bersuhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . pada saat penuangan, media PCA masih cair dengan suhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- d) Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan, dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata;
- e) Kerjakan Inspeksi blanko dengan mencampur air pengencer dan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) Biarkan sampai campuran dalam cawan petri membeku;
- g) Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 24 jam – 48 jam;
- h) Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni – 250 koloni setelah 48 jam;
- i) Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

#### **D.11.1.5 Pernyataan hasil**

##### **D.11.1.5.1 Cara menghitung**

1. Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni – 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.
2. Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni –



250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai bakteri per gram.

**CONTOH :**

$10^{-2}$	$10^{-3}$	
120	25	
	105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

3. Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni – 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

$n_1$  adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

$n_2$  adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

**CONTOH:**

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

4. Jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan.
- a. Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

**CONTOH:**

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- b) Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	Jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = 6.500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = 5.900.000 (6,5 \times 10^6)$

5. Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah .
6. Menghitung koloni perambat.
- Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- a. Merupakan rantai yang tidak terpisah;
- b. Perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan;



- c. Perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

#### D.11.1.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

1. Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas.  
Contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
2. Jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah.  
Contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
3. Jika angka ketiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
  - a. Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil.  
Contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - b. Bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap  
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

### D.11.2 Kapang

#### D.11.2.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 5 hari.

#### D.11.2.2 Pembenihan dan pengencer

- a) *Peptone dilution fluid* atau *pepton water*;
- b) *PDA (potato dextrose agar)* atau pembenihan yang lainnya (*Mycophil*, *Malt extract agar*) yang ditambahkan dengan antibiotik klorotetrasiklin atau kloramfenikol atau streptomisin. Tambahkan 1 ml larutan antibiotik atau 1 gram antibiotik ke dalam 250 ml pembenihan dan aduk kemudian tuangkan ke dalam 100 ml air suling steril;



c) PDA (*Potato dextrose agar*)

- |                                |         |
|--------------------------------|---------|
| - Infusion from white potatoes | 200 g   |
| - Dextrose                     | 20 g    |
| - Agar                         | 15 g    |
| - Air suling                   | 1000 ml |

Larutkan semua bahan. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

**D.11.2.3 Peralatan**

- Cawan petri 100 mm x 15 mm;
- Pipet ukur 1 ml dan 10 ml;
- Penangas air (45 ± 1) °C;
- Lemari pengeringan 25 °C atau suhu kamar;
- Alat penghitung koloni;
- Mikroskop.

**D.11.2.4 Cara kerja**

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai 4-11, 1-4 a);
- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran  $10^1$ - $10^2$  ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- Tuangkan 15 ml – 20 ml PDA ke dalam masing-masing cawan petri dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama. Pada saat penuangan PDA masih dalam bentuk cair pada suhu (45 ± 1) °C;
- Goyang cawan petri dengan hati-hati (putar dengan arah goyang kedepan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga tercampur merata;
- Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
- Masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam lemari pengeringan dan inkubasi pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari;
- Hitung koloni kapang dan khamir (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai hari ke lima);
- Nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang per gram contoh;

**D.11.2.5 Pernyataan hasil**

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni – 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang dan khamir per gram.

Keterangan:

- Koloni kapang biasanya buram dan berbulu
- Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam)
- Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang atau dan kamir



### D.11.3 Coliform dan E. Coli

#### D.11.3.1 Prinsip

Dengan ditandai pembentukan gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

#### D.11.3.2 Peralatan

- Cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- Pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- Botol pengenceran ( $\pm 20$  ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- Lemari pengering (Inkubator),  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- Tabung reaksi dan tabung Durham;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi,  $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ .

#### D.11.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LST) broth*;
- Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- E. C. Broth*;
- Levine's Eosin methylene blue (L-EMB) agar*;
- Plate Count Agar (PCA)*;
- gram stain;
- Tryptone (tryptophane) broth*;
- Pereaksi Kovacs';
- MR - VP broth;
- Pereaksi Voges Proskauer;
- Larutan Methyl Red;
- Koser's Citrate Medium*;
- Peptone Water*;
- Pereaksi Indole;
- Larutan Kalium Hidroksida 40 %;
- Buffer fields phosfat buffered dilution water (BPBDW)*.

#### D.11.3.4 Cara kerja

##### D.11.3.4.1 Presumptive test untuk bakteri Coliform (Uji dugaan)

##### D.11.3.4.2 Persiapan contoh uji

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai 4 -11, 1-4 a)
- Inkubasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik - 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- Masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- Periksa tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- $(24 \pm 2)$ , jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- Tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;



- f) Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi ( $48 \pm 2$ ) jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri coliform untuk tabung-tabung yang negatif;
- g) Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

#### D.11.3.4.3 **Confirmed test untuk bakteri Coliform (Uji penegasan)**

- a) Kocok tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) Masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu ( $35 \pm 1$ ) °C selama  $48 \pm 2$ ) jam;
- d) Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel 1, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama ( $48 \pm 2$ ) jam pada ( $35 \pm 1$ ) °C;
- e) Laporkan sebagai APM bakteri coliform per gram.

#### D.11.3.4.4 **Confirmed test untuk *Escherichia Coli***

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan;
- c) Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersikulasi, selama ( $48 \pm 2$ ) jam pada ( $45,5^\circ \pm 0,2$ ) °C. Penangas air dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung;
- d) Periksa tabung EC tersebut pada jam ke- ( $48 \pm 2$ ) jika telah terbentuk gas dalam jumlah berapapun maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Kocok tabung-tabung EC yang positif secara hati-hati;
- f) Digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm
- g) Inkubasikan pinggan L-EMB tersebut selama (18-24) jam pada ( $35 \pm 1$ ) °C;
- h) Periksa pinggan - pinggan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam;
- i) Dari tiap pinggan L - EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia;
- j) Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama (18 – 24) jam pada 35 °C. Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, E coli adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora;
- k) Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC;
  - Pembentukan indol
    - Inokulasi tabung tryptone broth.
    - Inkubasi selama ( $24 \pm 2$ ) jam pada ( $35 \pm 1$ ) °C.
    - Uji adanya indol dengan menambahkan (0,2 - 0,3) ml pereaksi Kovacs'.
    - Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
  - Reaksi Voges Proskauer dan *Methyl red*
    - Inokulasi tabung medium MR - VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama ( $48 \pm 2$ ) jam pada ( $35 \pm 1$ ) °C.
    - Secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril.
    - Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin.



- Uji Voges Proskauer adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
- Tabung medium MR - VP yang semula, diinkubasikan kembali selama 48 jam pada  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
- Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung.
- Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
- Penggunaan Sitrat
  - Dengan hati - hati tabung Koser's citrate medium diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat - zat lain.
  - Inkubasikan selama 96 jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$
  - Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).
- Pembentukan gas dari Lactose

Inokulasikan tabung kaldu LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu  $35 ^\circ\text{C}$ . Periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

#### D.11.3.4.5 Klasifikasi dan laporan

**Tabel 2 Reaksi biokimia E. coli pada uji IMVIC**

Jasad	Indol	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrate
Escherichia Coli				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai E. coli apabila IMVIC adalah + + - - atau - + - -, pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora atau coccus yang membentuk Gas dalam kaldu LST pada waktu inkubasi  $48 \pm 2$  jam.
- Hitunglah APM E. coli dengan menggunakan tabel APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung E coli.



**Tabel 3 APM/MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01, dan 0,001g/ ml contoh**

Tabung yang positif			APM/MPN	Tabung yang positif			MPN
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	15	3	2	1	150
2	0	0	9	3	2	2	220
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

**CATATAN** Bila inokulasi contoh 0,1; 0,01; 0,001; g atau ml untuk masing-masing 3 tabung, kalikan hasilnya dengan 10.



## Bibliografi

- CAC/RM 42-1969.1996, *FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Foods (AQL-6.5)*.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000, AOAC Official Method 926.06, *Macaroni Products, Preparation of Sample*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 32.5.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000, AOAC Official Method 926.07-B, *Solid (Total) and Moisture in Macaroni Products*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 32.5.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000, AOAC Official Method 925.11-A, *Ash of Macaroni Products*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 32.5.03.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000, AOAC Official Method 960.52, *Microchemical Determination of Nitrogen*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 12.1.07.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000, AOAC Official Method 971.21, *Mercury in Food, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000, AOAC Official Method 969.32, *Zinc in Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 9.2.38.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000, AOAC Official Method 986.15, *Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 17<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- BAM. 2000. *Bacteriological Analytical Manual*.





















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)